



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C12Q 1/68, C12P 19/34, G01N 33/53		(11) Numéro de publication internationale: WO 95/07361
AI		(43) Date de publication internationale: 16 mars 1995 (16.03.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01068		(81) Etats désignés: CA, CH, DE, GB, JP, SE, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Date de dépôt international: 9 septembre 1994 (09.09.94)		
(30) Données relatives à la priorité: 93/10821 10 septembre 1993 (10.09.93) FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.
(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).		
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MEO, Tommaso [FR/FR]; 18, rue Quincampoix, F-75004 Paris (FR). TOSI Mano [FR/FR]; 11, allée Buffon, F-94700 Maisons-Alfort (FR). VERPY, Elisabeth [FR/FR]; 51, rue du Val d'Osne, F-94410 Saint-Maurice (FR). BIASOTTO, Michel [FR/FR]; 5, rue de Draveil, F-91260 Juvisy-sur-Orge (FR).		
(74) Mandataire: LE BRUSQUE, Maurice; Cabinet Haré & Phélip, 21, rue de la Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).		
(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF MOLECULES CONTAINING NUCLEOTIDIC MISMATCHES AND LOCATION THEREOF, AND APPLICATION TO DETECTION OF SUBSTITUTIONS OR DELETIONS OF BASES IN NUCLEOTIDIC SEQUENCES		
(54) Titre: PROCEDE DE DETECTION DE MOLECULES CONTENANT DES MESAPPARIEMENTS NUCLEOTIDIQUES ET DE LOCALISATION DE CES MESAPPARIEMENTS, ET APPLICATION A LA DETECTION DE SUBSTITUTIONS OU DE DELETIONS DE BASES DANS DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES		
(57) Abstract Method for the detection and/or location of mutations or deletions in nucleotidic sequences by the formation of heteroduplexes between two double strand DNA types capable of generating mismatches at the mutation or deletion sites. The heteroduplexes are revealed by marking of each type of strand using different fluorescent molecules or are screened by passing over a support which specifically retains them.		
(57) Abrégé Procédé de détection et/ou de localisation de mutations ou de délétions dans des séquences nucléotidiques par création d'hétéroduplex entre deux types d'ADN double brin susceptibles de former des mésappariements aux sites desdites mutations ou délétions. Les hétéroduplex sont mis en évidence du fait du marquage sur chaque type de brin par des molécules fluorescentes différentes ou sont criblés par passage sur un support les retenant spécifiquement.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bresil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	Republique centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LE	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROCEDE DE DETECTION DE MOLECULES CONTENANT DES
MESAPPARIEMENTS NUCLEOTIDIQUES ET DE LOCALISATION DE
CES MESAPPARIEMENTS, ET APPLICATION A LA DETECTION DE
SUBSTITUTIONS OU DE DELETIONS DE BASES DANS DES
5 SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES.

La présente invention a pour objet un procédé
de détection de molécules contenant des
mésappariements nucléotidiques et de localisation de
ces mésappariements, et son application à la détection
10 de substitutions ou de délétions de bases dans des
séquences nucléotidiques

La majorité des maladies liées à des
modifications du génome, soit des organismes hôtes,
soit des organismes infectieux est très souvent due à
15 un simple changement d'un ou plusieurs nucléotides.
Aussi, des efforts considérables ont été entrepris
afin de développer des méthodes pour détecter non
seulement des mutations déjà connues mais aussi pour
mettre en évidence des mutations inconnues.

20 Cependant , les méthodes disponibles pour
rechercher des mutations ponctuelles inconnues dans
des régions d'ADN de taille importante ont toutes des
inconvénients qui rendent leurs utilisations
difficiles.

25 Par exemple , les gels d'électrophorèse avec
gradient de dénaturation nécessitent des optimisations
à l'aide d'ordinateur de la région cible et des
conditions d'électrophorèse adaptées à chaque fragment
d'ADN (Myers et al. (1987), Methods Enzymol, 155, 501-
30 527).

La technique de conformation polymorphique du
simple brin (SSCP), (Orita et al. (1989) - Genomics,
5, 874), en dépit de sa simplicité expérimentale , a
montré une sensibilité pour la détection de mutation
35 dans des fragments d'ADN d'environ 150 paires de

bases.

Cependant , aucune de ces méthodes ne donne d'informations précises concernant la localisation de la mutation dans le fragment d'ADN .

5 Les méthodes de séquençage direct , bien que de plus en plus rapides , restent coûteuses et longues à mettre en oeuvre pour la recherche de mutations de natures inconnues et ne se sont pas fiables dans le cas de mutations ponctuelles hétérozygotes .

10 Une autre méthode mettant en oeuvre une coupure chimique au niveau des mésappariements (CCM) telle que décrite par Cotton et al.(Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1988) 85, 4397-4401) est en principe bien adaptée à la mise en évidence de mutations, indépendamment de la
15 longueur et de la composition de la séquence de la région à laquelle on s'intéresse . Elle a été utilisée avec succès dans un grand nombre d'études et a fait récemment l'objet d'une revue (Cotton (1993) Mutation Research 285, 125-144) .

20 Cette méthode a permis la détection de mutations dans des fragments amplifiés par voie enzymatique d'une longueur d'un kilobase.

Aucune méthode actuellement n'est susceptible d'être utilisée de façon routinière pour différentes
25 raisons : manque de fiabilité (nombre important de faux négatifs) et ensuite en raison de la complexité des méthodes qui font qu'elles ne se prêtent pas à une exécution automatisée.

Par exemple dans la méthode CCM classique , les
30 hétéroduplex, c'est-à-dire les ADN double brin , ou bicaténaires , résultant d'un appariement entre deux molécules d'ADN hétérologues , sont formés entre l'ADN amplifié par voie enzymatique du patient et un fragment d'ADN représentant la séquence de type
35 sauvage marqué à une extrémité à l'aide d'un isotope

radioactif . Les molécules d'ADN hétéroduplex sont formées avec l'ADN correspondant à la séquence de type sauvage marqué à l'extrémité de chacun des brins, codant et non codant, puis sont traitées chimiquement dans des réactions parallèles afin de révéler les mésappariements .

En théorie , en utilisant deux sondes , toutes les mutations devraient être détectées , après les coupures spécifiques des cytosines et des thymines non appariées respectivement induites par l'hydroxylamine et le tétr oxyde d'osmium, puisqu'une cytosine ou une thymine non appariée doit être présente au site de la mutation , soit sur le brin codant soit sur le brin non codant de la sonde marquée par un isotope radioactif .

En pratique , la coupure au niveau de certains mésappariements peut se faire incorrectement , en raison de la nature des bases non appariées et de l'environnement de ces bases .

Ainsi, les sondes utilisées dans la méthode CCM classique ne permettent pas d'avoir simultanément quatre types d'hétéroduplex. Par exemple, Cotton et al. (1993, précédemment cités) ne décrivent qu'un ou deux types d'hétéroduplex.

Un autre inconvénient de cette technique est la nécessité de répéter le marquage radioactif des amorces pour la polymérisation en chaîne (PCR) et des marqueurs de tailles.

De plus, cette technique rend nécessaire la préparation d'une double série d'hétéroduplex , avec marquage terminal du brin sens et du brin non-sens, afin de détecter séparément les bases modifiées sur l'un ou l'autre brin .

Enfin, la méthode CCM ne permet pas de détecter tous les hétéroduplex et donc ne permet pas de

détecter certaines mutations.

On entend par sonde une séquence nucléotidique marquée comportant un nombre de nucléotides suffisant pour établir la complémentarité spécifique entre cette
5 séquence et la séquence présente dans l'échantillon.

A titre d'exemple, une sonde utilisée selon l'invention peut comporter de 8 à 2.000 nucléotides.

On entend par hétéroduplex un brin d'ADN amplifié avec un brin complémentaire contenant au
10 moins un mésappariement ou une délétion ou boucle de non appariement.

Les demandeurs se sont donc attachés à la mise en oeuvre d'une technique plus fiable, plus rapide et automatisable, permettant une détermination sans
15 ambiguïté de la substitution de base, comprenant un nombre réduit d'étapes, et utilisant des marqueurs non radioactifs.

Les demandeurs ont donc montré de manière surprenante que l'on pouvait détecter et positionner
20 d'une manière plus rapide et plus fiable les substitutions de bases dans des séquences nucléotidiques en marquant chacun des brins sens et non-sens par un marqueur fluorescent ou enzymatique.

L'utilisation de marqueurs fluorescents est
25 aussi un avantage en ce qui concerne les conditions générales de mise en oeuvre de la méthode tant du point de vue sécurité que du point de vue appareillage. Elle permet d'autre part d'utiliser des marqueurs différents pour chaque brin, sans que ce double
30 marquage implique des difficultés techniques ou matérielles, comme ce serait le cas si l'on devait procéder à un double marquage radioactif.

Les demandeurs ont en outre montré que l'on pouvait détecter de manière rapide des délétions ou
35 substitutions de bases en criblant les hétéroduplex

sur un support les retenant spécifiquement.

Les demandeurs ont aussi montré que , dans le cas de mutations hétérozygotes , on peut mettre en évidence les substitutions de base à partir seulement de l'ADN amplifié de l'échantillon à analyser , sans qu'intervienne dans la réaction un ADN issu d'individus homozygotes présentant l'allèle de type sauvage .

Ce mode de mise en oeuvre particulier de l'invention évite ainsi d'avoir à préparer un ADN de type sauvage marqué , ce qui élimine une étape dans la réaction et en limite les coûts . Ainsi , la mise en oeuvre de ce mode préférentiel nécessite d'utiliser seulement de l'ADN de l'échantillon à analyser .

L'invention a de manière générale pour objet la détection et/ou la localisation de mutations ou de délétions dans des séquences nucléotidiques par création d'hétéroduplex entre deux types d'ADN double brin susceptibles de former des mésappariements aux sites desdites mutations et délétions.

Selon un premier mode de mise en oeuvre les hétéroduplex sont mis en évidence du fait du marquage sur chaque type de brin , sens et non-sens, par des molécules fluorescentes différentes .

Selon un second mode de mise en oeuvre les ADN ne sont pas marqués et les hétéroduplex sont criblés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

La présente invention a donc pour objet, selon le premier mode de mise en oeuvre un procédé de détection de la présence et de la position de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin à tester dans lequel :

- on amplifie de manière spécifique la région

contenant la séquence nucléotidique d'une part de l'ADN à tester et d'autre part d'un ADN dont la séquence est connue, et l'on marque les brins sens et non sens de ces ADN à l'aide de marqueurs fluorescents, ou de marqueurs non-isotopiques, différents,

- on hybride les ADN amplifiés, et
- on met en évidence les hétéroduplex formés.

Avantageusement, l'ADN à tester et l'ADN connu sont amplifiés dans la même préparation.

Elle a d'autre part pour objet un procédé de détection de la présence et de la position de substitutions ou de délétions de bases d'une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin hétérozygote ou hétérogène à tester dans lequel:

- on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique de l'ADN à tester et on marque les brins sens et non sens de cet ADN à l'aide de marqueurs fluorescents, ou de marqueurs non-isotopiques, différents,

- on hybride l'ADN amplifié, et
- on met en évidence les hétéroduplex formés.

Avantageusement, l'ADN hétérogène est constitué d'un mélange d'ADN de deux variants d'une bactérie ou d'ADN extrait de cellules mosaïque d'une tumeur.

Selon un mode particulier de mise en oeuvre, les échantillons d'ADN double brin comprenant la séquence nucléotidique à déterminer sont amplifiés par la méthode de polymérisation en chaîne à l'aide de deux amorces situées aux deux extrémités de la séquence que l'on veut amplifier.

Les deux amorces peuvent être marquées respectivement à l'aide de marqueurs fluorescents différents.

La molécule d'ADN double brin à déterminer possède avantageusement une taille comprise entre 150 et 10.000 paires de bases.

Préférentiellement, les hétéroduplex sont mis en évidence par clivage des parties des brins non-appariées.

L'étape d'hybridation est effectuée, selon un mode de mise en oeuvre connu de l'homme du métier, par dénaturation et renaturation de l'ADN amplifié, ce qui permet de former des molécules mésappariées si l'ADN contient, à l'état hétérozygote (maladies génétiques) ou de manière hétérogène à l'état de mosaïque cellulaire (masse tumorale mélangée avec des cellules saines en diverses proportions) ou une plusieurs mutations (délétions ou substitutions).

Dans le cas où l'ADN dans lequel on recherche la mutation provient d'une cellule haploïde, les molécules hétéroduplex se forment si l'amplification d'un mélange d'ADN des deux types, sauvage et muté, a été effectuée.

Préférentiellement, le réactif coupant les parties non appariées est un réactif chimique, tel que l'hydroxyl amine, le tétroxyde d'osmium ou le permanganate de potassium ou une enzyme telle que la MutY (Lu et Chang, (1992), Genomics, 14, 249-255) ou une des enzymes, endonucléases et glycosylases, décrites par Chang et Lu en 1991 (Nucleic Acid Res., 19, 4761-4766), par Chehab et Kan en 1989 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 9178-9182), par Hennecke et al. en 1991 (Nature, 353, 776-778), par Nickerson et al. en 1990 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8923-8927), par Wieabauer et Jiricny en 1990 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5842-5845) ou par Yeh et al. en 1991 (J. Biol. Chem., 266, 6480-6484).

Ils peuvent aussi être mis en évidence par une

méthode biophysique permettant de les différencier des homoduplex, telle que la chromatographie ou l'électrophorèse;

Avantageusement, les hétéroduplex sont, 5
préalablement à leur mise en évidence, concentrés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

Selon le second mode de mise en oeuvre, l'invention a pour objet un procédé de détection de la présence de substitutions ou de délétions de bases 10
dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin à tester dans lequel :

- on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique d'une part de l'ADN à tester et d'autre part d'un ADN dont la 15
séquence est connue,

- on hybride les ADN amplifiés , et
- on met en évidence les hétéroduplex formés par passage sur un support les retenant 20
spécifiquement.

Elle a d'autre part pour objet un procédé de détection de la présence de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin hétérozygote ou hétérogène à tester dans lequel :

- on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique de l'ADN à tester, 25
- on hybride l'ADN amplifié, et
- on met en évidence les hétéroduplex formés par passage sur un support les retenant 30
spécifiquement.

Préférentiellement, ledit support porte une protéine liant de manière spécifique les hétéroduplex telle que la MutS. Les hétéroduplex retenus sont révélés par une molécule se fixant spécifiquement sur 35
l'ADN, telle que le bromure d'éthidium ou par tout

autre moyen à la portée de l'homme du métier, tel que la fluorescence ou la radioactivité.

Ledit support peut être constitué de billes, sphères ou particules ou être la paroi d'un puits
5 d'une microplaque pour test biochimique, recouverts d'un anticorps anti-MutS.

La présente invention est particulièrement adaptée à la détection de substitutions de bases chez des patients atteints de maladies héréditaires ,
10 telles l'angiodème , l'hémoglobinopathie, la mucoviscidose, la dyotrophie musculaire et chez des patients atteints de maladies cancéreuses telles que le cancer du sein, la leucémie, le cancer du colon et les maladies liées à l'atteinte de séquences oncogènes
15 ou antioncogènes.

L'intérêt du second mode de mise en oeuvre de l'invention réside dans le fait qu'il permet de cribler rapidement un grand nombre de préparations d'ADN, une population par exemple.

20 S'il permet une détection d'une mutation, il ne permet pas sa localisation qui peut quant à elle être effectuée par un procédé selon le premier mode de mise en oeuvre.

La présente invention a en outre pour objet une
25 composition comportant au moins trois sondes permettant de former des hétéroduplex avec des séquences nucléiques dans lesquelles on recherche la présence ou l'absence de mutations ponctuelles.

Elle a enfin pour objet, des hétéroduplex
30 associés à un complexe constitué par une molécule de type MutS et un anticorps anti-MutS.

La présente invention peut être aisément mise en oeuvre par l'homme du métier utilisant ses connaissances générales dans le domaine de la
35 biologie, et en particulier dans le domaine de la

polymérisation en chaîne .

Des renseignements généraux plus particuliers concernant les techniques nécessaires pour la mise en oeuvre des méthodes objets de la présente invention peuvent notamment être trouvés dans "PCR Protocols. A guide to methods and applications" (Innis et al., Academic Press Inc., Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 1990).

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels :

- la figure 1A représente la structure de l'exon 8 du gène C1-inhibiteur et de régions environnantes ,
- la figure 1B représente la séquence de l'exon 8. Cette séquence a été décrite par Tosi et al.((1986), Gene, 42, 265-272) et Carter et al. ((1991), J. Biochem., 197, 301-308).
- la figure 2A schématise les différents hétéroappariements pouvant avoir lieu dans les régions des codons 452 et 459,
- les figures 2B et 2C représentent respectivement l'intensité de fluorescence de différents oligonucléotides obtenus après respectivement traitement par l'hydroxylamine et le tétroxyde d'osmium de produits d'hybridation entre les allèles sauvages et mutants correspondant aux régions comprenant les codons 452 et 459,
- la figure 3A schématise les hétéroappariements pouvant avoir lieu dans la région des codons 458 et 467 ,
- la figure 3B représente le profil de coupure par le tétroxyde d'osmium de mésappariements d'ADN d'un patient hétérozygote pour la mutation Val458Met,
- la figure 3C représente le même type de

profil pour la mutation Pro467Arg ,

- la figure 3D est le profil obtenu par traitement des mésappariements de la figure 3C par l'hydroxylamine ,

5 - la figure 4A représente le fragment de 588 paires de base comprenant le site de restriction de l'enzyme HgiA1,

10 - la figure 4B est la photo d'un gel de migration des produits du traitement par l'hydroxylamine d'appariements entre l'allèle sauvage et l'allèle d'un patient présentant une double mutation en cis dans le fragment illustré sur la figure 4A , à différentes dilutions ,

15 - la figure 4C représente le profil après traitement par l'hydroxylamine des produits de coupure du brin non-codant dans une situation où l'ADN n'a pas été dilué ,

20 - la figure 4D est un agrandissement de régions contenant les pics en position 295 et 317 de la figure 4C , à différentes dilutions .

Matériels et méthodes .

Echantillons d'ADN

25 36 patients non liés atteints d'angioedeme dont l'analyse par des techniques d'hybridations sur membrane (blot) n'a pas révélé d'altérations géniques ont été étudiés et les essais ont porté sur les mutations ponctuelles dans l'exon 8 en utilisant la méthode classique de CCM (Cotton et al. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401) et la méthode de séquençage de l'ADN .

Fabrication de sondes marquées par des marqueurs fluorescents .

35 Des amorces oligonucléotidiques ont été synthétisées sur un synthétiseur Beckman 200A DNA ou un synthétiseur Applied Biosystem 392 (ABI) DNA/RNA .

Un microgramme d'ADN génomique isolé à partir de leucocytes du sang périphérique a été amplifié par la technique de polymérisation en chaîne (dite PCR) dans un milieu réactionnel de 100 μ l , en utilisant des amorces oligonucléotidiques E1 et E2 , comme illustré sur la figure 1A.

La réaction a été effectuée durant 30 à 35 cycles. La sonde marquée par fluorescence a été obtenue par réamplification , durant 25 cycles , en utilisant 2 μ l du produit de la première réaction d'amplification et en utilisant les mêmes amorces rendues fluorescentes par couplage d'un ester d'un colorant et du N-hydroxyl succinimide à un coupleur aminohexyl lié à l'extrémité 5' selon le protocole ABI.

La séquence de l'oligonucléotide E1, qui est marquée avec le fluorophore JOE est : 5'-GTG AAC TTG AAC TAG AGA AAG C-3' .

La séquence de l'oligonucléotide E2, qui est marquée avec le fluorophore FAM , est : 5'- TGA GGA TCC CAC GAA CTG CCA G-3'.

Formation d'hétéroduplex et clivage chimique des mésappariements .

Des fragments amplifiés par polymérisation en chaîne et doublement marqués sont précipités à l'éthanol . Les quantités d'ADN sont estimées sur un gel d'agarose et 450 ng d'ADN sont utilisés afin de former des hétéroduplex . Les échantillons sont portés à ébullition durant 5 minutes dans 150 μ l de NaCl 1,3 M/MgCl₂ 3,5 mM/ Tris-HCl 3 mM pH 7,7 , refroidis sur de la glace durant 5 minutes puis incubés durant la nuit à 42°C.

Après hybridation , les échantillons sont précipités avec de l'éthanol et resuspendus dans 18 μ l d'eau.

Le protocole de base pour effectuer la coupure

chimique des mésappariements a été décrit par Cotton et al. ((1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401) .

5 6 μ l d'hétéroduplex d'ADN sont utilisés pour chaque modification chimique . Pour chaque expérience , 5 ml d'hydroxychlorure d'hydroxylamine 7M sont préparés dans de l'eau distillée et 4 ml sont titrés jusqu'à un pH de 9 par addition de diéthylamine .

10 6 μ l d'ADN sont traités par 20 μ l d'une solution d'hydroxylamine à 37°C durant 45 minutes ou 1 heure . La concentration finale d'hydroxylamine est approximativement de 3,8 M.

15 Le tétr oxyde d'osmium (4 % en poids de la solution dans l'eau) est dilué dans de l'eau distillée jusqu'à obtention d'une solution de base à 1 % et des aliquotes sont stockés à - 80°C dans des tubes siliconés .

20 6 μ l d'ADN sont incubés durant 15 minutes à température ambiante dans une solution de tétr oxyde d'osmium 0,4 % / pyridine 2 % / Hepes pH 8 0,5 mM / Na₂EDTA 0,5 mM dans un volume total de 25 μ l dans des tubes siliconés .

25 Les réactions sont arrêtées en transférant les échantillons dans de la glace et en ajoutant 200 μ l d'acétate de sodium 0,3 M pH 5,2/Na₂EDTA 0,1 mM/tRNA de levure 50 μ g/ml. L'ADN est précipité à l'aide de 2,5 volumes d'éthanol dans de la glace carbonique . Après centrifugation , les culots d'ADN sont lavés deux fois avec de l'éthanol à 70 %, resuspendus dans 30 200 μ l d'acétate de sodium 0,3 M pH 5,2 et reprécipités une nouvelle fois par de l'éthanol . Après deux lavages à l'éthanol , les culots séchés sont resuspendus dans 50 μ l de pipéridine 1 M et incubés à 90°C durant vingt minutes. Après la coupure 35 par la pipéridine , 5 μ g de tRNA de levure et 50 μ l

d'acétate de sodium 0,6 M pH6 sont ajoutés et l'ADN est précipité par l'éthanol . Les culots sont lavés deux fois avec de l'éthanol à 70 % , resuspendus dans 100 µl d'eau distillée, lyophilisés et resuspendus dans 8 µl de formamide 83 %/Na₂EDTA 8,3 mM. 4 µl de chaque échantillon , mélangés avec 0,5 µl de marqueur de poids moléculaire fluorescent (GS2500P ROX, ABI) sont chargés sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 6 % dans un séquenceur d'ADN automatique commercialisé par ABI . Les résultats sont rassemblés et analysés en utilisant le logiciel GENESCAN 672 (ABI) .

EXEMPLE 1 :

Détection de mutations dans le gène C1-inhibiteur de patients atteints d'angioedème héréditaire .

Des mutations dans le gène C1-inhibiteur de patients atteints d'angioedème héréditaire constituent un modèle d'étude de la méthode objet de la présente invention .

Le gène C1-inhibiteur est long de 17 kb et est composé de 8 exons . En choisissant les amorces oligonucléotidiques dans des introns et à proximité de l'extrémité 5' et 3' des exons , on peut facilement obtenir par amplification par la méthode de polymérisation en chaîne des fragments de longueurs comprises entre 600 paires de base (pb) et 1000 pb comprenant aussi bien des exons individuels que des groupes d'exons et couvrant toutes les régions frontières intron-exon .

L'exon 8 a été amplifié à l'aide des amorces E1 et E2 comme illustré sur la figure 1A qui représente de manière schématique l'organisation de la région contenant l'exon 8 . Comme le montre cette figure , l'amorce E1 est située à l'intérieur de la région 3' non transcrite , 211 paires de base en aval du codon

stop . L'amorce E2 est située quant à elle à l'intérieur de l'intron 7 , 147 paires de base en amont du premier nucléotide de l'exon 8. Les 84 codons de cet exon sont reproduits sur la séquence de la figure 1B.

Huit mutations ponctuelles différentes , la plupart se traduisant par une détérioration de la production de la protéine C1-inhibiteur, ont été trouvées à l'aide de la technique conventionnelle CCM. De plus , une permutation de G en A à l'intérieur du codon 458 induit un polymorphisme déjà connu pour le site de l'enzyme de restriction Hgi AI (Bock et al. 1986, Biochemistry , 25, 4292-4301). Les mutations Gln452Glu (permutation de C en G) et Pro459Arg (permutation de T en G) , qui sont reliées par la ligne pointillée sur la figure 1B, ont été trouvées sur le même chromosome .

L'ADN du patient portant ces mutations a donc été isolé pour rechercher les conditions de clivage partiel qui permettent la détection de mésappariements multiples sur le même brin d'ADN .

Comme le montre la figure 2B , le clivage par l'hydroxylamine des résidus C non appariés sur le brin non codant donne naissance à deux pics correspondant à des tailles de 295 et 317 nucléotides respectivement , comme on pouvait le prédire à partir des types de molécules hétéroduplex formés qui sont schématiquement représentés sur la figure 2A . Sur la figure 2A, les brins sens sont identifiés par un carré représentant un marquage fluorescent particulier tandis que les brins non-sens sont identifiés par un rond correspondant à un autre marquage.

Les deux pics obtenus présentent une intensité importante , par rapport à l'intensité de la fluorescence du matériel non clivé. On note qu'en fait

seulement un quart des molécules d'ADN sont supposées contenir le mésappariement qui rend les résidus C facilement accessibles à l'hydroxylamine .

5 Tandis que l'intensité du pic en position 295 reflète directement la nature de la modification et du clivage , l'intensité de fluorescence en position 317, qui est la plus distante par rapport au site de marquage fluorescent , est faible par rapport au clivage supposé à ce site .

10 Ces résultats et des résultats similaires obtenus avec le tétr oxyde d'osmium indiquent que les conditions utilisées permettent la détection de clivages multiples sur le même brin. En fait des conditions légèrement plus douces de traitement par 15 l'hydroxylamine ont été utilisées ultérieurement en raison du faible clivage sur la position la plus lointaine de coupure (pic 317) et ont permis d'obtenir des clivages de l'ordre de 100 %.

20 La figure 2 illustre aussi que l'on obtient des informations redondantes en marquant les produits correspondant aux deux types d'allèle .

25 Sur la figure 2A , les brins dérivés d'allèle de type sauvage sont représentés en gras, et les distances des bases intéressantes sont indiquées à partir du marquage fluorescent terminal .

30 La figure 2B est relative à la coupure par l'hydroxylamine des résidus C non appariés . L'axe horizontal représente la taille des fragments simples brins d'ADN dérivés des brins codants et non codants . L'échelle de taille des nucléotides est obtenue à l'aide du marqueur de taille , qui est marqué avec un troisième colorant fluorescent . L'échelle verticale indique les intensités de fluorescence en unité arbitraire .

35 La figure 2 C représente la détection de

résidus T non appariés en utilisant le tétr oxyde d'osmium .

La flèche présente sur la figure indique un résidu T apparié , adjacent au mésappariement , qui a subi néanmoins une coupure importante .

Dans cet exemple les deux mutations, situées respectivement dans les codons 452 et 459 se sont révélées par un total de six coupures distinctes . Parmi celles-ci deux ont eu lieu sur des bases appariées adjacentes aux mésappariements. Sur le brin codant, les résidus C ont donné naissance à un pic double faible mais significatif en présence d'hydroxylamine autour de la position 362 . Sur le brin non- codant le résidu T a donné naissance après traitement par le tétr oxyde d'osmium au pic en position 316. On notera que les coupures sur des bases appariées adjacentes, quoique habituellement plus faibles que celles obtenues sur des résidus non appariés , peuvent avoir lieu sur la moitié des duplex, et non sur seulement un quart , comme le montre de manière typique le cas de mésappariements contenant des T ou des C .

Le gain en sensibilité de la détection résultant de l'utilisation de marquages différents des deux brins d'ADN, combinée avec l'analyse par ordinateur permet d'obtenir les résultats mentionnés dans l'insert de la figure 2B, qui représente un agrandissement du pic double autour de la mutation en position 362 du brin codant , en surimpression sur les tracés du résultat obtenu sur un même brin pour trois individus n'ayant pas cette mutation . On note que des clivages ont lieu sur les cytosines en position 357 et 369.

EXEMPLE 2 :

Effet du type de base non appariée et de la

composition en bases voisines , sur les coupures par le tétr oxyde d'osmium et l'hydroxylamine .

Les neuf mutations représentées sur la figure 1 ont permis d'étudier l'effet quantitatif du type de base non appariée et de la composition en bases voisines , sur les coupures par les deux réactifs .

Le tableau illustre les comparaisons effectuées à partir de deux expériences indépendantes . Tandis que les efficacités de coupure obtenues avec l'hydroxylamine sont substantiellement supérieures à celles obtenues avec le tétr oxyde d'osmium, l'environnement nucléotidique des mésappariements semble avoir un effet similaire sur les deux types de clivage , puisqu'on retrouve la même hiérarchisation des efficacités de coupure pour les deux réactifs .

Seulement quelques mutations ne répondent pas à cette règle . Par exemple , les mutations Pro 476 Ser et Leu 459 Pro sont plus sensibles aux modifications par l'hydroxylamine , ce qui est dû à la présence dans les deux cas de trois résidus cytosine consécutifs sur le site de clivage . De manière similaire , le taux de coupure relativement important par le tétr oxyde d'osmium des hétéroduplex sur le site Val451Met est probablement dû à la présence de deux résidus T consécutifs adjacents au T mésapparié . Cependant des mésappariements C.C se distinguent par leur sensibilité importante aux modifications , bien que placés au sein d'un environnement nucléotidique différent . Ceci peut être dû non seulement à la coupure forte par l'hydroxylamine mais aussi à la coupure forte observée en présence de tétr oxyde d'osmium sur les résidus T immédiatement adjacents.

Dans le cas de la mutation Gln452 Glu, l'asymétrie apparente de l'efficacité de coupure , dépendante du brin pris en compte , peut être aussi

due à la présence sur le brin non codant d'un résidu C adjacent à un résidu non apparié .

Le tableau permet aussi d'estimer le nombre de produits de clivage qui peuvent être attendus en général pour chaque mutation ainsi que l'indication des limites de détection des produits dans le cas de coupures faibles .

Chaque mutation donne naissance à au moins deux pics fluorescents détectables résultant du clivage de bases mésappariées , mais dans plusieurs cas , des informations additionnelles ont été obtenues à partir du clivage de bases appariées adjacentes , indiquées dans le tableau par des flèches .

La grande majorité des produits de coupure sont facilement détectés , à cause de l'intensité de leur signal fluorescent qui est très nettement supérieur au bruit de fond. La surimpression de tracés telle qu'effectuée dans l'insert de la figure 2B est nécessaire seulement dans le cas de signaux représentant moins de 10 % des double brins clivables, tels que ceux obtenus avec le tétr oxyde d'osmium sur des mésappariements résultant des mutations Arg472 STOP et Val458Met (tableau) .

Le profil de coupure par le tétr oxyde d'osmium d'un patient hétérozygote pour la mutation Val458Met , qui donne naissance à un polymorphisme sans effet , et pour la mutation pathogène Pro467Arg est illustré sur les figures 3B et 3C .

Le polymorphisme de la mutation Val458Met est facilement détecté , par traitement par l'hydroxylamine , et identifié par un pic à la position 299 du brin non codant , comme indiqué sur la figure 3A qui est un schéma représentant la partie du gène contenant ces deux mutations .

Sur la figure 3A les brins d'ADN représentés

par des lignes épaisses sont ceux dérivés de l'allèle présentant à son site polymorphique un résidu G, ce qui est le plus fréquent.

5 Ce pic n'est néanmoins pas discernable dans le cas du traitement au tétr oxyde d'osmium par mesure directe de la fluorescence du brin non codant , qui porte un T mésapparié au site correspondant à cette mutation (figure 3B) . Cependant , le brin codant présente une coupure beaucoup plus forte , à la position 387, due à la présence d'un résidu T
10 immédiatement adjacent au mésappariement déstabilisant C.C et G.G. à la moitié des molécules appariées .

De plus , la comparaison des tracés agrandis de la même région dans le cas du traitement d'ADN
15 d'autres individus par le tétr oxyde d'osmium , comme représenté dans l'insert de la figure 3B, montre que T est en fait présent à la position 299 du brin non codant . La réactivité avec le tétr oxyde d'osmium de ce mésappariement T-G est inhabituellement faible .
20 Ceci est dû au fait que l'intensité du pic résultant est seulement légèrement supérieure à celle des bases T.A appariées environnantes , comme le montre l'insert représentant le brin non codant à partir de la position 283 jusqu'à la position 316.

25 On notera néanmoins que ce mésappariement G.T est présent seulement dans un des quatre duplex . Le profil témoin montré dans l'insert , dans lequel le pic en position 299 n'est pas présent , est celui d'individus homozygotes G.C à ce site polymorphique .
30 En fait , les variations entre individus , c'est-à-dire entre homozygotes A.T et G.C à ce site polymorphique peuvent être facilement détectées comme le montrent les figures 3C et 3D , correspondant respectivement à des traitements par le tétr oxyde
35 d'osmium et l'hydroxylamine.

Le profil en tétr oxyde d'osmium (figure 3 C) de l'homozygote en position 299 est de manière surprenante similaire à celui de l'hétérozygote dans l'insert de la figure 3B , à l'exception du pic en position 299 qui est faiblement inférieur à ce qui est mis en évidence avec les mésappariements G.T. De plus, les homozygotes C.G , utilisés comme témoins non coupés dans les figures 3B et 3C , donnent naissance à un pic distinct dans le profil obtenu après réaction avec l'hydroxylamine , contrairement au profil obtenu avec des homozygotes A.T (figure 3D). Bien que cet exemple représente le cas particulier d'un site polymorphique , qui donne naissance à des génotypes appropriés pour faire la différence entre un clivage de bases appariées et non appariées , l'apparition d'un nouveau pic T ou C absent dans le profil d'autres individus , est un indice suffisant même si l'amplitude de ce pic est du même ordre que celui résultant du clivage de paires de bases environnantes.

EXEMPLE 3 :

Détermination du seuil de détection de la méthode .

Un patient avec une double mutation en cis , dont le profil de coupure est indiqué sur les figures 2B et 2C , donne naissance à un nombre important de fragments d'intensités variables , ce qui permet de tester facilement le seuil de détection de la méthode, en diluant ce matériel avec différentes quantités du matériel génétique sauvage . De plus, la région amplifiée par voie enzymatique du chromosome affecté de ce patient peut être détaillée de manière quantitative dans des dilutions en série , car Leu459Arg détruit le site de reconnaissance de l'enzyme Hgi AI, souligné dans la figure 1.

L'ADN génomique de ce patient a été dilué avec

des quantités croissantes d'ADN normal et amplifié par la voie enzymatique . L'importance du chromosome portant les mutations a été vérifiée , après la première amplification par polymérisation de chaîne (PCR) en étudiant dans des dilutions en séries la disparition du fragment de 588 paires de bases représenté sur la figure 4A , qui est résistant à la digestion par l'enzyme Hgi AI. Des aliquotes de chaque dilution en séries ont été ensuite soumis aux modifications chimiques par le tétroxyde d'osmium et l'hydroxylamine .

La figure 4B montre que jusqu'à une dilution d'un facteur cinq de l'ADN , c'est-à-dire un chromosome portant la mutation pour dix chromosomes , les mésappariements sont facilement détectés .

Afin de simplifier les figures , on a fait figurer simplement le résultat de la coupure par l'hydroxylamine du brin non codant , pour de l'ADN non dilué et dilué , puisque des diminutions similaires d'intensité sont mesurées , après dilution , dans les autres profils de clivage de la figure 2.

La figure 4B est un gel sur lequel sont représentées les différentes dilutions de l'ADN ainsi que de l'ADN témoin de type sauvage (puits C) .

La figure 4 C représente le profil du brin non codant , après traitement de l'ADN par l'hydroxylamine, pour le patient hétérozygote et dans une situation où l'ADN n'a pas été dilué.

La figure 4D est un agrandissement de la région contenant les pics aux positions 295 et 317. Sur cette figure, on a indiqué les intensités des pics à une dilution de moitié (1/2) du dixième (1/10) ainsi que l'intensité du spectre obtenu avec l'ADN témoin d'un individu de type sauvage .

Même le pic double obtenu avec l'hydroxylamine

pour le brin codant autour de la position 362 (cf. insert de la figure 2A) est détectable , à une dilution d'1/10 du chromosome .

CONCLUSION :

5 Les résultats de ces exemples de mise en oeuvre de l'invention montrent de manière claire que la méthode objet de la présente invention permet de déterminer, de manière fiable et sensible , la présence et la position de substitutions de bases dans
10 des séquences nucléotidiques .

Cette détection est rendue possible du fait du double marquage différentiel des deux brins , à l'aide de marqueurs fluorescents .

15 La méthode objet de la présente invention est en outre mise en oeuvre de manière plus rapide que la méthode conventionnelle CCM , et présente de plus l'avantage d'utiliser des produits de marquage fluorescents stables .

20 La méthode objet de la présente invention diffère en outre des méthodes décrites dans l'état de la technique en ce que :

- elle permet d'obtenir de manière optimale un grand nombre de mésappariements et donc d'informations, du fait du marquage de l'allèle
25 mutant,

- les brins codant et non-codant sont marqués de manières différentes , ce qui réduit ainsi au minimum le nombre de réactions chimiques et permet une localisation précise des mutations ,

30 - le bruit de fond spécifique d'un brin donné lors des coupures à une position donnée est très reproductible et rend détectable des mésappariements qui ordinairement sont peu coupés , tels que des polymorphismes homozygotes , comme le montre la figure
35 3 . Ainsi , en utilisant le bruit de fond des coupures

comme séquence de référence , on peut séquencer la mutation de manière précise , au nucléotide près .

La sensibilité particulièrement importante de la méthode objet de la présente invention devrait
5 permettre de déterminer la présence et la position de substitutions de base chez des individus homozygotes et hétérozygotes , dans le cas de caractère héréditairement transmis , mais aussi de détecter des mutations somatiques dans lesquelles le chromosome sur
10 lequel a lieu la mutation est dilué dans un grand nombre de chromosomes portant une allèle sauvage, ce que ne permettent en aucune manière les méthodes décrites dans l'état de la technique .

TABLEAU
Comparaison de l'environnement en bases sur la coupure de mésappariements
TETROXIDE d'OSMIUM

HYDROXYLAMINE		mésappariement		coupure (a) Expl Exp2		Mutation	Mésappariement	coupure (a) Expl Exp2	
Mutation									
Arg472stop	GGG ^C GAGT CCCC ^A CTCA	24	21			Arg472stop	GGG ^T GAGT CCCC ^G CTCA	< 1	< 1
Val450Met	CTTC ^A TGCT GAAG ^C ACCA	40	34			Val450Met (b)	CTTC ^G TGCT GAAGTACCA	9	4
Val451Met	TGAA ^A TGCA ACTT ^C ACGT	43	40			Pro476Ser	TGNC ^T CCAG ACTG ^G GGTC	10	8
Phe455Ser	CCCT ^C CCTC GGGA ^A GGAC	50	53			Phe455Ser (b)	CCCT ^T CCTC (b) GGGA ^G GGAC	ND (c)	8
Leu459Arg	GTGCT ^C TGG CACGGGACC	57	49			Leu459Pro (b)	GTGC ^T CTGG CACG ^G GACC	23	11
Pro476Ser	TGNC ^C CCAG ACTG ^A GGTC	56	58			Val451Met (b)	TGAA ^G TGCA ACTT ^T ACGT	34	19
Leu459Pro	GTGC ^C CTGG CACG ^A GACC	61	62			Leu459Arg (b)	CACG ^G GACC CACGGGACC	43	31
Gln452Glu	ACTG ^C AGCA (d) TCAC ^C TGGT	67	66						

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de la présence et de la
5 position de substitutions ou de délétions de bases
dans une séquence nucléotidique comprise dans une
préparation d'ADN double brin à tester dans lequel :

- on amplifie de manière spécifique la région
contenant la séquence nucléotidique d'une part de
10 l'ADN à tester et d'autre part d'un ADN dont la
séquence est connue , et l'on marque les brins sens et
non sens de ces ADN à l'aide de marqueurs
fluorescents, ou de marqueurs non-isotopiques,
différents.

15 - on hybride les ADN amplifiés , et
- on met en évidence les hétéroduplex formés
par clivage des parties des brins non-appariées.

2. Procédé de détection de la présence et de la
position de substitutions ou de délétions de bases
20 d'une séquence nucléotidique comprise dans une
préparation d'ADN double brin hétérozygote ou
hétérogène à tester dans lequel:

- on amplifie de manière spécifique la région
contenant la séquence nucléotidique de l'ADN à tester
25 et on marque les brins sens et non sens de cet ADN à
l'aide de marqueurs fluorescents, ou de marqueurs non-
isotopiques, différents,

- on hybride l'ADN amplifié, et
- on met en évidence les hétéroduplex formés
30 par clivage des parties des brins non-appariées.

3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé
en ce que l'ADN hétérogène est constitué d'un mélange
d'ADN de deux variants d'une bactérie ou d'ADN extrait
de cellules mosaïque d'une tumeur .

35 4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé
en ce que l'ADN à tester et l'ADN connu sont amplifiés

dans la même préparation .

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le réactif coupant les parties non appariées est un réactif chimique , tel que l'hydroxylamine ou le tétroxyde d'osmium.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le réactif coupant les parties non appariées est une enzyme, telle que la MutY.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les hétéroduplex sont, préalablement à leur mise en évidence, concentrés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les ADN comprenant la séquence nucléotidique à déterminer sont amplifiés par la méthode de polymérisation en chaîne à l'aide de deux amorces situées aux deux extrémités de la séquence que l'on veut amplifier.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les deux amorces sont marquées respectivement à l'aide de marqueurs fluorescents différents.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la taille de la molécule d'ADN double brin correspondant à la séquence nucléotidique est comprise entre 150 et 10.000 paires de bases.

11. Procédé de détection de la présence de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin à tester dans lequel :

- on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique d'une part de l'ADN à tester et d'autre part d'un ADN dont la

séquence est connue,

- on hybride les ADN amplifiés , et
- on met en évidence les hétéroduplex formés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

5 12. Procédé de détection de la présence de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin hétérozygote ou hétérogène à tester dans lequel :

- on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique de l'ADN à tester,
- on hybride l'ADN amplifié, et
- on met en évidence les hétéroduplex formés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

13. Procédé selon l'une des revendications 7, 11 et 12 caractérisé en ce que ledit support porte une protéine liant de manière spécifique les hétéroduplex.

20 14. Procédé selon la revendication 13 , caractérisé en ce que ladite protéine est la MutS.

15. Procédé selon l'une des revendications 11 et 12, caractérisé en ce que les hétéroduplex retenus sont révélés par une molécule se fixant spécifiquement sur l'ADN, telle que le bromure d'éthidium.

25 16. Composition comportant au moins trois sondes permettant de former des hétéroduplex avec des séquences nucléiques dans lesquelles on recherche la présence ou l'absence de mutations ponctuelles.

30 17. Hétéroduplex associé à un complexe constitué par une molécule de type MutS et un anticorps anti-MutS

1/4

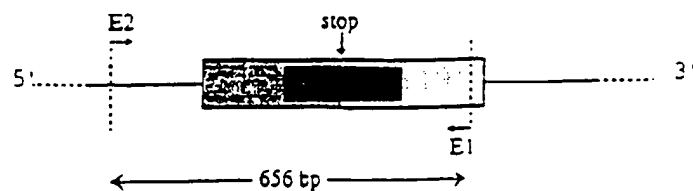


FIG. 1A

AA TTC TTC GAT TTT TCT TAT GAC CTT AAC CTG TGT GGG
 Glu Phe Phe Asp Phe Ser Tyr Asp Leu Asn Leu Cys Gly

CTG ACA GAG GAC CCA GAT CTT CAG GTT TCT GCG ATG CAG CAC CAG ACA
 Leu Thr Glu Asp Pro Asp Leu Gln Val Ser Ala Met Gln His Gln Thr

GTG CTG GAA CTG ACA GAG ACT GGG GTG GAG GCG GCT GCA GCC TCC GCC
 Val Leu Glu Leu Thr Glu Thr Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala

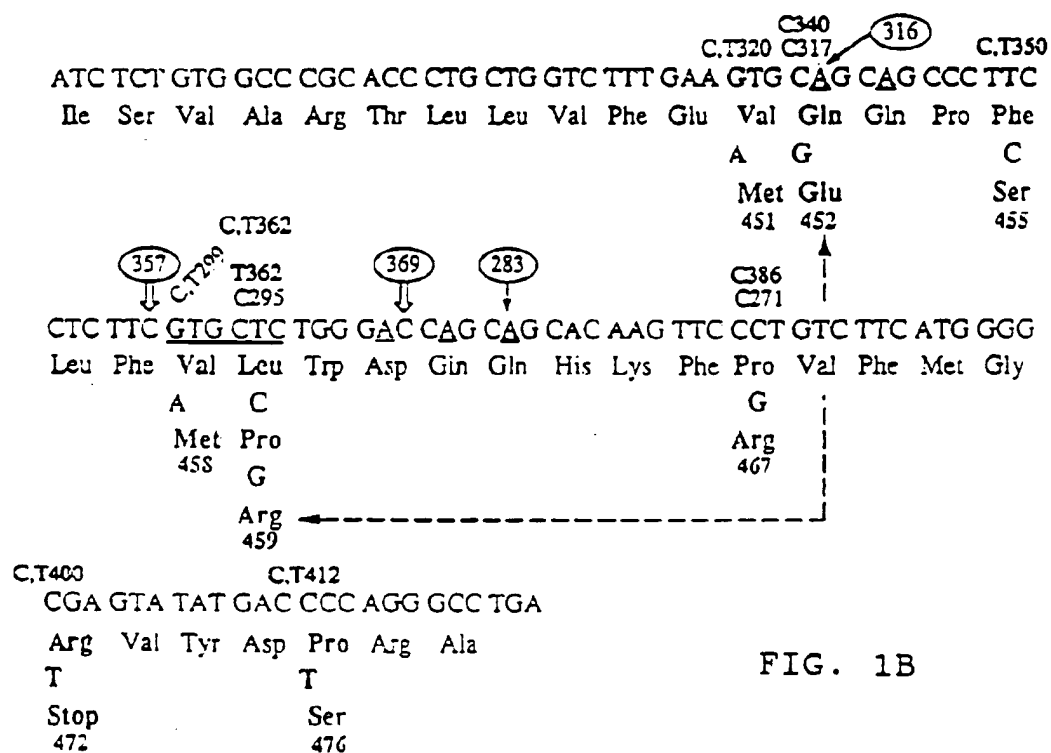


FIG. 1B

2/4

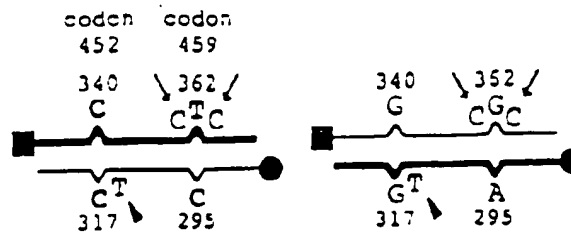


FIG. 2A

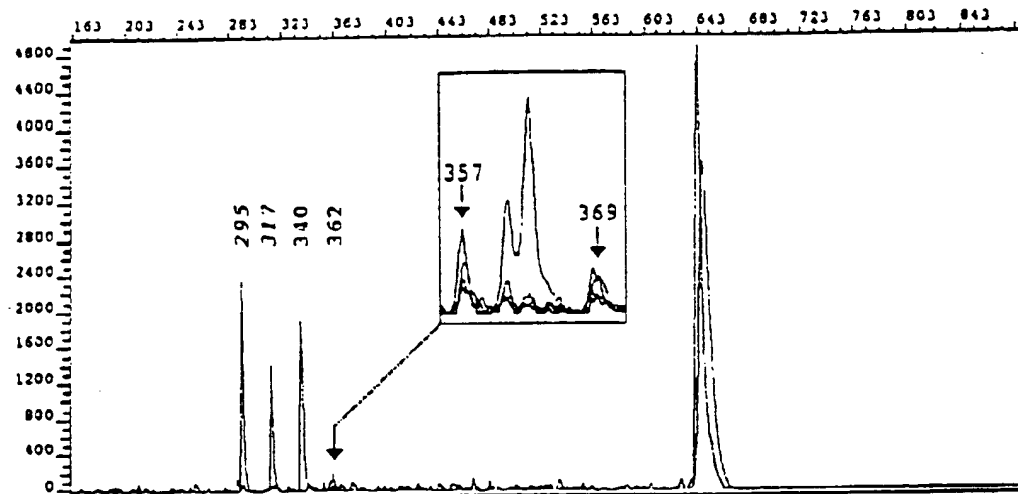


FIG. 2B

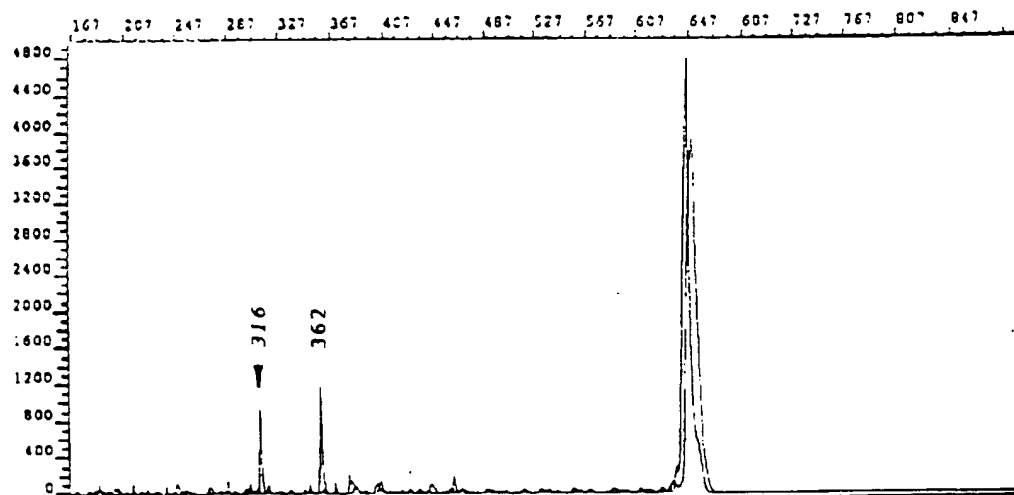


FIG. 2C

3/4

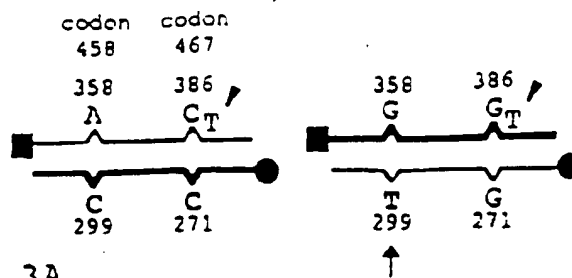


FIG. 3A

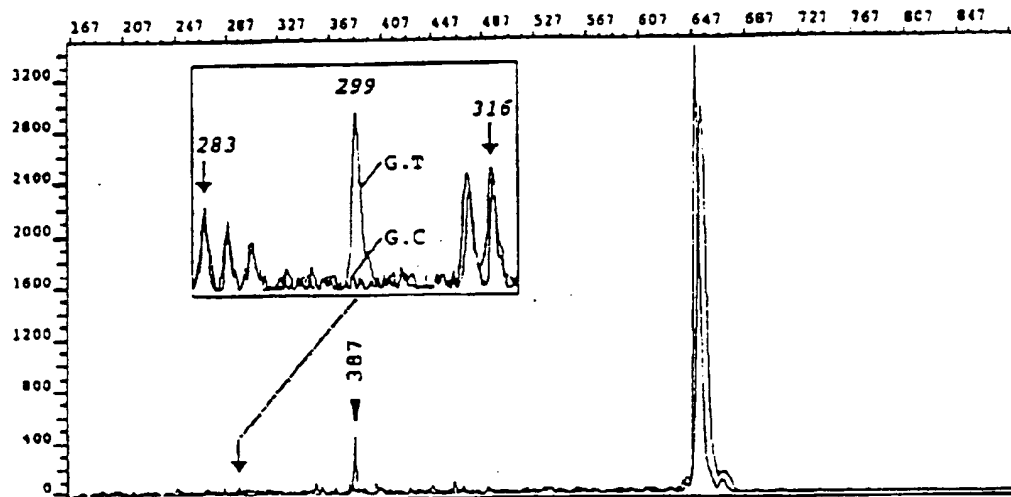


FIG. 3B

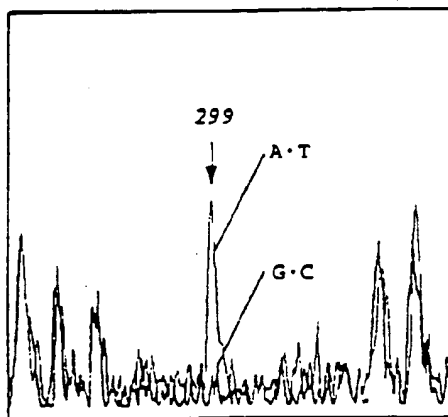


FIG. 3C

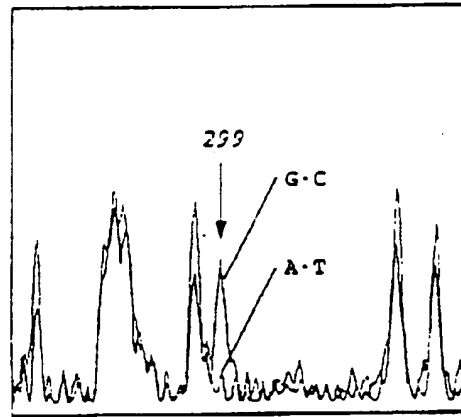


FIG. 3D

4/4

5 1 3 2 1 c
10 10 10 10 10

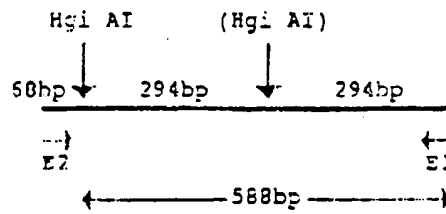


FIG. 4A

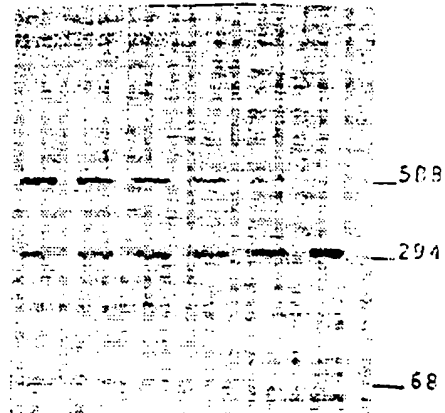


FIG. 4B

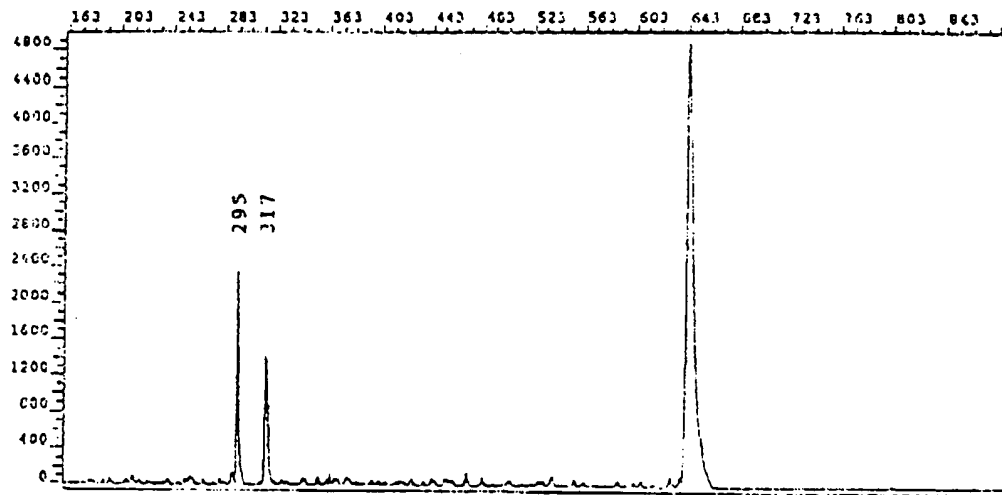


FIG. 4C

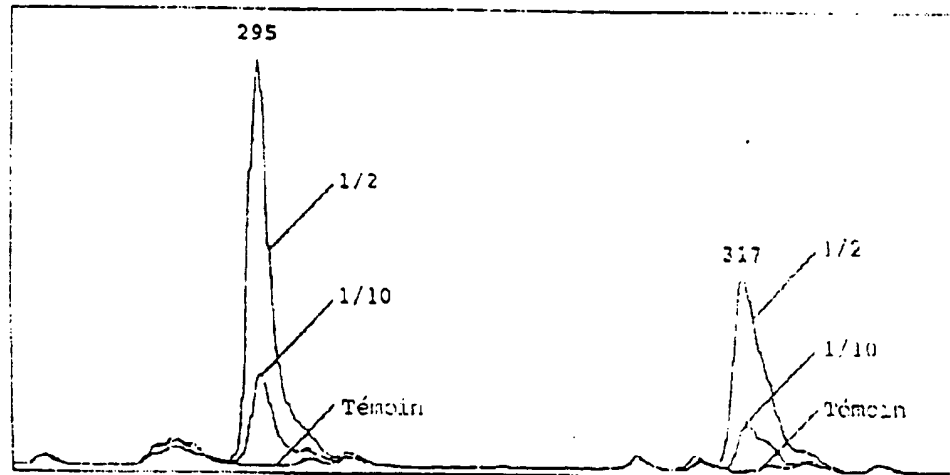


FIG. 4D

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6 C12Q1/68 C12P19/34 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOGENETICS, vol.18, 1991, OXFORD, UK pages 147 - 153 WOOD, N. ET AL 'HLA-DR/DW MATCHING BY PCR FINGERPRINTING' see the whole document ---	1-10, 13, 14
Y	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol.2, no.9, September 1993, UK. pages 1481 - 1482 FRIEDL, W ET AL 'single-step screening method for the most common mutations in familial adenomatous polyposis' see the whole document ---	1-10, 13, 14
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'd' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 December 1994		02.01.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2210 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Osborne, H

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUMAN GENETICS, vol.87, no.6, 1991, BERLIN, DE. pages 728 - 730 CAI, S-P. ET AL 'a rapid and simple electroretic method for the detection of mutations involving insertion or deletion.' ---	1-10,13, 14
Y	WO,A,90 13668 (LIFECODES CORP.) 15 November 1990 see page 9 - page 18; claims 1-4 ---	1-10,13, 14
Y	EP,A,0 317 239 (NATIVE PLANTS INCORP.) 24 May 1989 see page 8 - page 9; claims 1,2 ---	1-10,13, 14
X	WO,A,93 02216 (UPSTATE BIOTECHNOLOGY INC) 4 February 1993 Y see the whole document * in particular page 54* ---	11,12, 15-17 1-10,13, 14
X	WO,A,89 11548 (CETUS CORP.) 30 November 1989 see example 5 ---	16
A	GENOMICS, vol.14, no.2, October 1992, SAN DIEGO US pages 249 - 255 LU, A-L. ET AL. 'detection of single base mutations with mismatch repair enzymes' cited in the application see the whole document ---	6
X	MUTATION RESEARCH, vol.285, 1993, AMSTERDAM NL pages 125 - 144 COTTON, R. 'Current methods of mutation detection' see page 137 -----	1-5

1

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9013668	15-11-90	AU-A- 5645690	29-11-90
EP-A-0317239	24-05-89	JP-A- 2002400	08-01-90
		US-A- 5324631	28-06-94
WO-A-9302216	04-02-93	AU-A- 2415992	23-02-93
		CA-A- 2113716	04-02-93
		EP-A- 0596028	11-05-94
WO-A-8911548	30-11-89	AU-B- 632494	07-01-93
		AU-A- 3754289	12-12-89
		EP-A- 0451141	16-10-91
		JP-T- 3504328	26-09-91

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12Q1/68 C12P19/34 G01N33/53		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation mutuelle consultée (système de classification sur les symboles de classement) CIB 6 C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation mutuelle dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOGENETICS, vol.18, 1991, OXFORD, UK pages 147 - 153 WOOD, N. ET AL 'HLA-DR/DW MATCHING BY PCR FINGERPRINTING' voir le document en entier	1-10, 13, 14
Y	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol.2, no.9, Septembre 1993, UK. pages 1481 - 1482 FRIEDL, W ET AL 'single-step screening method for the most common mutations in familial adenomatous polyposis' voir le document en entier	1-10, 13, 14
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la note du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "A" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 21 Décembre 1994		Date d'exposition du présent rapport de recherche internationale 02.01.95
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale: Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Parc de la NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Osborne, H

C.(state) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	No. des revendications visées
Y	HUMAN GENETICS, vol.87, no.6, 1991, BERLIN, DE. pages 728 - 730 CAI, S-P. ET AL 'a rapid and simple electroretic method for the detection of mutations involving insertion or deletion.'	1-10,13, 14
Y	WO,A,90 13668 (LIFECODES CORP.) 15 Novembre 1990 voir page 9 - page 18; revendications 1-4	1-10,13, 14
Y	EP,A,0 317 239 (NATIVE PLANTS INCORP.) 24 Mai 1989 voir page 8 - page 9; revendications 1,2	1-10,13, 14
X	WO,A,93 02216 (UPSTATE BIOTECHNOLOGY INC) 4 Février 1993	11,12, 15-17
Y	voir le document en entier * particulièrement page 54*	1-10,13, 14
X	WO,A,89 11548 (CETUS CORP.) 30 Novembre 1989 voir exemple 5	16
A	GENOMICS, vol.14, no.2, Octobre 1992, SAN DIEGO US pages 249 - 255 LU, A-L. ET AL. 'detection of single base mutations with mismatch repair enzymes' cité dans la demande voir le document en entier	6
X	MUTATION RESEARCH, vol.285, 1993, AMSTERDAM NL pages 125 - 144 COTTON, R. 'Current methods of mutation detection' voir page 137	1-5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No.

PCT/FR 94/01068

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets)	Date de publication
WO-A-9013668	15-11-90	AU-A- 5645690	29-11-90
EP-A-0317239	24-05-89	JP-A- 2002400	08-01-90
		US-A- 5324631	28-06-94
WO-A-9302216	04-02-93	AU-A- 2415992	23-02-93
		CA-A- 2113716	04-02-93
		EP-A- 0596028	11-05-94
WO-A-8911548	30-11-89	AU-B- 632494	07-01-93
		AU-A- 3754289	12-12-89
		EP-A- 0451141	16-10-91
		JP-T- 3504328	26-09-91